

东北虎粪细菌区系的 16S rRNA 基因序列分析

图 雅¹ 朱伟云^{2*} 陆承平¹

(南京农业大学¹ 农业部动物疫病诊断与免疫重点开放实验室² 消化道微生物实验室 南京 210095)

摘 要: 为研究东北虎粪微生物区系建立了东北虎粪细菌的 16S rDNA 文库。通过 *Eco*R I 和 *Hind* III 分别对阳性克隆进行酶切分析,从东北虎的 16S rDNA 文库中分别获得了 15 个具有酶切差异的克隆。BLAST 分析结果显示,在 15 个克隆中,10 个克隆与梭菌属成员有 97% 以上的同源性,其中有 6 个序列与诺维梭菌 A 型(*Clostridium novyi* type A)有 99% 的同源性,为诺维梭菌 A 型;4 个序列与猪粪细菌 RT-18B(*Swine manure bacterium* RT-18B)有 97% 的同源性,为消化链球菌属(*Peptostreptococcus*)成员。其它序列与 GenBank 中登录的序列同源性低于 97%,为 5 种未培养细菌,其中 4 种 16S rRNA 基因序列分别与 *Clostridium pascui*、破伤风梭菌 E88(*Clostridium tetani* E88)、梭菌(*Clostridium* sp.) 14505 及产气荚膜梭菌(*Clostridium perfringens*)有 94% ~ 95% 的相似性。第 5 种与肉杆菌(*Carnobacterium* sp.) R-7279 株有 94% 的同源性。

关键词: 虎粪微生物区系, 16S rDNA 基因序列, 克隆文库, 系统进化树

中图分类号: Q939 文献标识码: A 文章编号: 1001-6209(2005)05-0671-04

动物的消化道中栖息着种类多样的、由细菌组成的微生物区系。目前这些微生物中的大多数无法用现有的技术培养^[1]。随着分子生物学技术的发展,对细菌的克隆、测序及序列分析已经成为分子生态学研究环境微生物强有力的工具。各种数据库中收录的 16S rDNA 的序列已经超过了 70000 个,为这种分子生态学的方法提供了可靠的分类依据。

人们对环境微生物的研究,主要是通过建立细菌 16S rDNA 克隆文库来认识其多样性的。Pace 等^[2]首次将 16S rRNA 基因序列分析技术,应用于环境微生物区系中微生物的分类鉴定及系统发育关系研究以来,关于环境细菌区系的报道已有许多,目前已建立了人的结肠、牛的瘤胃及猪的消化道细菌的 16S rDNA 文库^[3~5]。以虎为代表的肉食动物的消化道微生物的种类还未见报道。本研究对东北虎粪细菌区系组成进行了初探。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 实验材料 2 号东北虎及 2 号白虎当日新鲜粪采自北京八达岭野生动物园,于早 8:00 至 8:30,采集新鲜粪样立即 -20℃ 冻存。

1.1.2 主要试剂: dNTP,购于 Promega 公司; *Taq*

DNA 聚合酶、pMD18-T 载体、*Eco*R I、*Hind* III 等购于 TaKaRa 公司,胶回收试剂盒购于中科开瑞公司。

1.2 样品提取的方法

室温下解冻样品,溶于 PBS(pH 7.4)缓冲液中,制成 15% 的悬液,根据作者筛选的方法,采用超声波法裂解细菌,再以改良 CTAB 法抽提细菌核酸,作为 PCR 反应的模板。

1.3 PCR 反应及产物的纯化

PCR 反应的引物为细菌 16S rDNA 全长通用引物, 8f, 5'-CACGGATCCAGAGTTTGAT(C/T)(A/C)TGGCTCAG-3' 和 1510r, 5'-GTGAAGCTTACGC(C/T)TACCTGTACGACTT-3'^[1]。反应体系(50μL): 缓冲液 5μL, 10mmol/L dNTP 0.5μL, 25mmol/L MgCl₂ 5μL, EX *Taq* DNA 聚合酶 1.25μL, 1 ~ 10ng/mL 模板 1μL, 10μmol/L 上、下游引物各 1μL。反应条件: 94℃ 5min, 94℃ 20s, 52℃ 20s, 68℃ 40s, 30 个循环; 68℃ 10min。反应产物的纯化根据胶回收试剂盒的操作说明进行。

1.4 16S rDNA 克隆及插入子的检测

PCR 产物与 pMD18-T 载体的连接,以及感受态细胞(大肠杆菌 DH5α, *Escherichia coli* DH5α)的制备及转化,按《分子克隆实验指南》第二版的方法进行^[6]。在含有氨苄青霉素(50μg/100mL)抗性平板上

* 通讯作者。Tel 86-25-84395328; Fax 86-25-84395523; E-mail: hfling@public1.ptt.js.cn

作者简介: 图雅(1968-),女,内蒙古呼和浩特市人,博士研究生,研究方向为动物微生物学。E-mail: tuyu2000@126.com

收稿日期: 2004-11-15, 修回日期: 2005-06-03

培养、挑取阳性克隆。阳性克隆再用 M13f 和 M13r 引物进行 PCR 反应 ,以检测插入子的正确性 ,除退火温度提高至 56℃外 ,其它 PCR 反应条件和参数同上。

1.5 PCR 产物的 RFLP 图谱分析

将 PCR 反应检测获得的阳性克隆 PCR 产物 ,分别用限制性内切酶 *Eco*R I 及 *Hind* III 进行酶切分析 ,总反应体积为 10μL :4μL PCR 反应产物、0.1μL 限制性内切酶及缓冲液 1μL ,剩余体积以灭菌双蒸水补足。酶切反应在 37℃过夜进行。产物用 1.2% 琼脂糖电泳检测。

1.6 阳性克隆序列分析及进化树的建立

将 RFLP 图谱分析中有差异的阳性克隆进行测序分析 ,测序结果首先在 RDP 数据库中进行嵌合序列检测^[7]。在 GenBank 及 RDP 数据库中进行序列同源性比较。与在 GenBank 中选取的部分相似序列 ,采用 PHYLIP 软件中的 DNADIST ,对所有来源于

虎粪的序列与部分 GenBank 中的最相似序列比较 ,绘制进化系统进化树。

2 结果

2.1 虎粪细菌 16S rDNA 序列分析

92 个克隆经 PCR 检测后 ,获得 138 个阳性克隆。经过限制性酶切分析 ,筛选出 15 个不同的 16S rRNA 基因序列 ,其序列通过 BLAST 分析 ,15 个序列中有 10 个序列与梭菌属成员有 94% 以上的同源性 ,其中有 6 个序列在 1478 个碱基范围内与诺维梭菌有 99% 的同源性 ,鉴定为诺维梭菌的不同型。1E3、2F11、2F12 与 2B6 在 1392 范围内比对的结果都与猪粪细菌 RT-18B 有 97% 的相似性。其他序列与 GenBank 中的序列同源性低于 97% ,属于未培养细菌。其中 ,序列 1D3 与肉杆菌(*Carnobacterium* sp.) R-7279 株有 94% 的同源性(表 1)。

表 1 虎(*Panthera tigris*)粪细菌的 16S rDNA 的相似性比较结果
Table 1 Similarity of 16S rDNA retrieved from fecal flora of tiger(*Panthera tigris*)

Clone code and GenBank accession number	Nearest relative	Similarity/ %	Matching base
1C 4 AY558587	<i>Clostridium novyi</i> type A	99.5	1467/1474
1C 8 AY558588	<i>Clostridium novyi</i> type A	99.2	1466/1478
1C11 AY558590	<i>Clostridium novyi</i> type A	99.1	1463/1477
1G 2 AY558591	<i>Clostridium novyi</i> type A	99.5	1469/1477
2A 9 AY558592	<i>Clostridium novyi</i> type A	99.3	1466/1477
1D10 AY558589	<i>Clostridium novyi</i> type A	98.6	1456/1477
1E 3 AY581818	Swine manure bacterium RT-18B	97.7	1359/1391
2F11 AY581820	Swine manure bacterium RT-18B	97.5	1357/1392
2F12 AY581823	Swine manure bacterium RT-18B	97.3	1355/1392
2B 6 AY581819	Swine manure bacterium RT-18B	97.5	1357/1392
2F 5 AY581821	<i>Clostridium pascui</i>	95.9	778/811
1D 3 AY581816	<i>Carnobacterium</i> sp. R-7279	94.6	1248/1319
1E 4 AY685918	<i>Clostridium tetani</i> E88	94.4	1395/1478
2C12 AY685919	<i>Clostridium</i> sp. 14505	95.3	1408/1478
1E 2 AY581817	<i>Clostridium perfringens</i>	94.6	1470/1476

2.2 系统发育分析

虎粪细菌测序克隆分布于梭菌属的 6 个类群中 ,包括 3 个梭菌的类群、芽孢杆菌-乳酸杆菌-链球菌类群、消化链球菌类群、产丁酸菌类群(图 1)。

BLAST 分析显示 2F 5、1E 4 虽在序列的相似性上分别与 *Clostridium pascui* 及破伤风梭菌 E88 有较高的相似性 ,但在进化树中 ,两克隆在 728 个碱基范围内两序列间相似性较高。

1E2 在进化关系上同产气荚膜梭菌相近 ,与 BLAST 结果一致。1D3 与肉杆菌 R-7279 株有 94%

的同源性 ,在进化关系上 ,主要与低 G + C 革兰氏阳性菌 M51 及巨大芽胞杆菌(*Bacillus megaterium*) MO30 株亲缘关系相近。

2C12 在 1400 个碱基范围内与梭菌 14505 有 95% 的同源性 ,在进化关系上与肉毒梭菌 F 型 Eklund 202F 及氧化还原真杆菌(*Eubacterium oxidoreducens*)G2-2 株亲缘关系相近。

来自白虎粪的克隆 3G 9 测序结果与进化关系上都与多形链球菌相近。

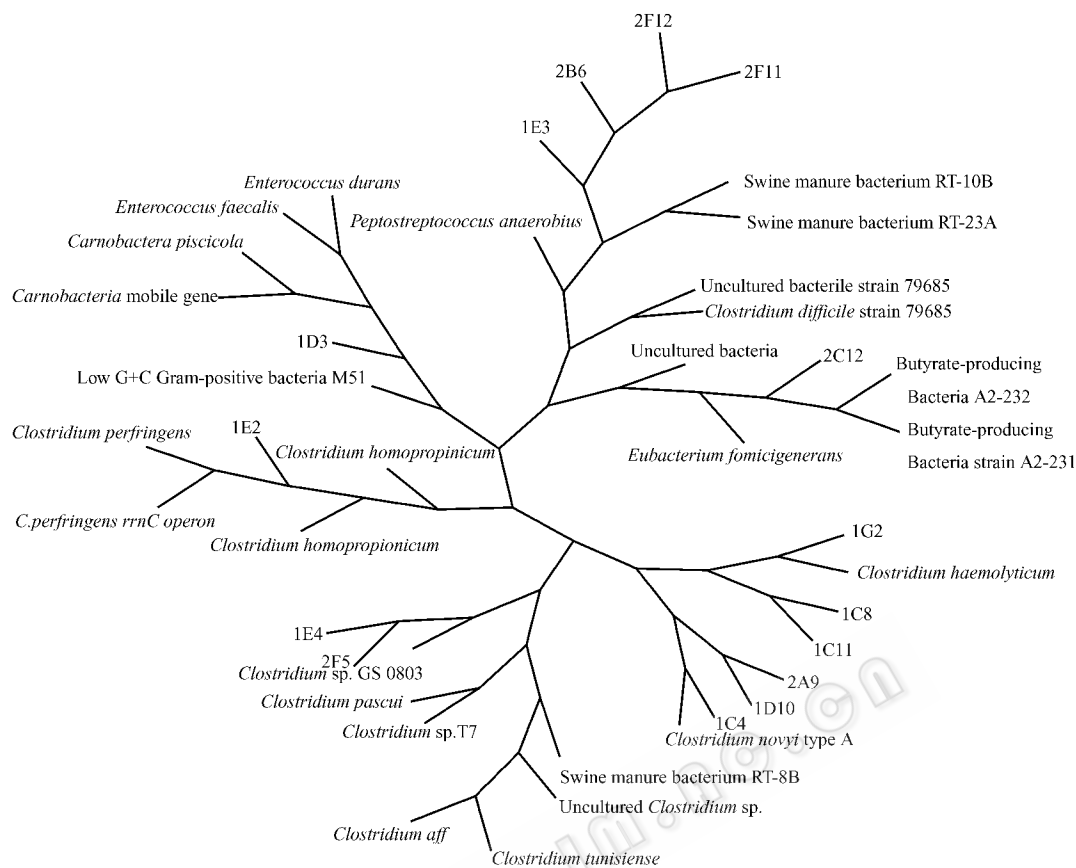


图 1 虎粪细菌测序克隆与 GenBank 中最相似序列的同源关系

Fig.1 Phylogenetic tree showing relationships between cloned 16S rDNA sequences that were from Siberian tiger feces and the closest relatives in GenBank

3 讨论

虎粪细菌区系的组成如何,至今未见报道。本研究对虎粪细菌区系组成进行了初步探讨,结果显示虎粪细菌区系的主要组成为梭菌属的成员,均属于低(G+C)含量的厌氧细菌。与草食动物及杂食动物相比,虎粪细菌区系简单,与其肠道结构特点相关。虎的肠道长度通常在6~8米范围内,体长/肠长比仅为1:4^[8]。消化道的空间大小及食物在消化道内转移的时间,是制约微生物生长繁殖的重要因素,可能是导致区系中细菌组成贫乏的主要原因之一。

现代细菌学倾向于细菌的基因型特征结合表型特征进行分类,公认的方法是依据细菌16S rRNA序列进行分类。目前建议的标准是,99%~100%全序列相似性的细菌,判定为同一个种,97%~99%相似者,定为同一个属^[9,10]。根据上述标准,虎粪中存在诺维梭菌、消化链球菌属成员等优势菌。

梭菌属的细菌是很多动物的肠道及粪样微生物区系中的优势菌,在虎粪中是最主要的优势菌。猪肠道和粪样中还有瘤胃球菌、真杆菌等优势菌。这

些优势菌的相互关系如何,值得进一步研究。

虎粪中4个与猪粪细菌RT-18B有97%同源性的克隆,在分类上属于消化链球菌属。Whitehead等^[11]指出,这类细菌广泛存在于自然界,并呈全球范围分布^[12]。在牛的瘤胃中少量存在,却可大量产氨,其在虎消化道中扮演的角色如何,尚不清楚。

参 考 文 献

[1] Amann R I , Ludwig W , Schleifer K H . Phylogenetic identification and *in situ* detection of individual microbial cells without cultivation . *Microbiol* , 1995 , **59** :143 – 169 .

[2] Pace N R , Stahl D A , Lane D J , *et al* . The analysis of natural microbial populations by ribosomal RNA sequences . *ASM News* , 1985 , **51** :4 – 12 .

[3] Tajima K , Aminov R I , Nagemine T , *et al* . Rumen bacterial diversity as determined by sequence analysis of 16S rDNA libraries . *FEMS Microbiology Ecology* , 1999 , **29** :159 – 169 .

[4] Sghir A , Doré J , Mackie R I . Molecular diversity and phylogeny of human colonic bacteria . In : Bell C R , *et al* . *Molecular Ecology in Gastrointestinal Systems Microbial Biosystems : New Frontiers* . Proceedings of the 8th International Symposium on Microbial Ecology . ed . Halifax : Atlantic Canada Society for Microbial Ecology , 1999 .

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

- [5] Konstantinov S R , Zhu W , Williams B A , *et al.* Effect of fermentable carbohydrates on piglet faecal bacterial communities as revealed by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of 16S ribosomal DNA. *FEMS Microbiol Ecol* , 2003 , **43** : 225 – 235.
- [6] Sambrook J , Fritsch E F , Maniatis T. 分子克隆实验指南. 金冬雁, 黎孟枫, 等译. 第二版. 北京: 科学出版社, 1996.
- [7] Cole J R , Chai B , Marsh T , *et al.* The Ribosomal Database Project (RDP-II) : previewing a new autoaligner that allows regular updates and the new prokaryotic taxonomy. *Nucleic Acids Res* , 2003 , **31** (1) : 442 – 443.
- [8] 张淑云, 王东风. 东北虎一些器官指数测定. 野生动物, 1993 , **6** : 41 – 43.
- [9] Drancourt M , Bollet C , Carlioz R , *et al.* 16S ribosomal DNA sequence analysis of a large collection of environmental and clinical unidentifiable bacterial isolates. *J Clin Microbiol* , 2000 , **38** : 3623 – 3630.
- [10] Janda J M , Abbott S L. Bacterial identification for publication : when is enough enough ? *J Clin Microbiol* , 2002 , **40** : 1887 – 1891.
- [11] Whitehead T R , Cotta M A. Isolation and identification of hyperammonia producing bacteria from Swine Manure Storage Pits. *Current Microbiol* , 2004 , **48** : 20 – 26.
- [12] Eschenlauer S C P , McKain N , Walker N D , *et al.* Ammonia production by ruminal microorganisms and enumeration , isolation , and characterization of bacteria capable of growth on peptides and amino acids from the sheep rumen. *Appl Environ Microbiol* , 2002 , **68** : 4925 – 4931.

Bacterial 16S rDNA sequence analysis of Siberian tiger faecal flora

TU Ya¹ ZHU Wei-yun^{2*} LU Cheng-ping¹

(¹ Key Laboratory of Animal Disease Diagnostic & Immunology , Ministry of Agriculture , ² Laboratory of Intestinal Microbiology , Nanjing Agricultural University , Nanjing 210095 , China)

Abstract : Bacterial 16S rDNA library of Siberian tiger was developed and 15 different clones were obtained using *EcoR* I and *Hind* III in restriction fragment length polymorphism analysis. DNA sequencing and similarity analysis showed that 10 clones matched corresponding *Clostridium* sequences , of which 6 sequences had over 99% similarity with *Clostridium novyi* type A , and 4 sequences had 97% similarity with Swine manure bacterium RT-18B , which identified as *Peptostreptococcus* spp. The other five 16S rDNA sequences had 94% ~ 95% similarity with *Clostridium pascui* , *Clostridium tetani* E88 , *Clostridium* sp. 14505 *Clostridium perfringens* and *Carnobacterium* sp. R-7279 respectively.

Key words : Faecal flora of tiger , 16S rDNA sequences , Clone library , Phylogenetic tree

* Corresponding author. Tel 86-25-84395328 ; E-mail : hfling@public1.ptt.js.cn

Received date : 11-15-2004

《微生物学报》加入“万方数据”等数字化期刊群的声明

为适应我国信息化建设需要,扩大作者学术交流渠道,本刊已加入《中国学术期刊(光盘版)》和“中国期刊网”。从2002年开始,凡被本刊录用的文章均统一纳入“万方数据——数字化期刊群”,进入因特网提供信息服务。本刊所付稿酬包含刊物内容上网服务报酬,不再另付。

通常在期刊的出版过程中,不可能将其中的一篇撤掉。因此,本刊建议:凡不同意转让光盘版和网络版的作者,敬请改投其他刊物。

读者可上网查询浏览本刊内容,刊物网址: <http://wsxb.periodicals.com.cn>